

高良姜黄酮提取物特征谱分析及成分确认

韩亮¹, 石忠峰², 芮雯², 冯毅凡^{2*}

(1. 广东药学院产业办公室, 广州 510006; 2. 广东药学院中心实验室, 广州 510006)

[摘要] 目的: 建立不同批次高良姜提取物的特征谱并进行成分鉴定。方法: 采用 HPLC 分析高良姜提取物的特征指纹谱。Sunfire™ C₁₈ 色谱柱, 流动相乙腈-0.1% 的甲酸溶液梯度洗脱, 分析时间 60 min, 检测波长 208 nm, 柱温 30 °C, 流速 1.0 mL·min⁻¹。采用超高效液相色谱串联四级杆飞行时间质谱联用技术 (UPLC/Q-TOF MS) 进行分析, 对主要成分进行鉴定。结果: 特征谱共标出 10 个共有峰。鉴定出提取物中 12 个化合物。结论: 采用 HPLC 特征指纹谱能有效控制高良姜提取物的质量。

[关键词] 高良姜; 高效液相色谱; 指纹图谱; 超高效液相色谱串联四级杆飞行时间质谱联用技术

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)21-0082-04

Fingerprint Analysis and Chemical Constituent Identification of Extract of *Rhizoma Alpiniae Officinarum*

HAN Liang¹, SHI Zhong-feng², RUI Wen², FENG Yi-fan^{2*}

(1. Industrial Office, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China;
2. Central Laboratory, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the method of fingerprint analysis of the extract of galangal and identify its chemical constituents. **Method:** HPLC analysis was performed on an Sunfire™ C₁₈ (4.6 mm × 200 mm, 5 μm) column with the acetonitrile-0.1% HCOOH gradient. Fingerprint was finished in 60 min. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. The monitoring wavelength was at 208 nm. The column temperature was at 30 °C. The major components were identified by UPLC/Q-TOF MS. **Result:** Ten common peaks were separated on the fingerprint, 12 compounds were identified from the extract. **Conclusion:** The method is reliable, accurate and can be used as a quality control method for the extract of galangal.

[Key words] galangal; HPLC; fingerprint; UPLC/Q-TOF MS

高良姜为山姜属植物高良姜 *Alpinia officinarum* Hance 的干燥根茎, 主产于福建、台湾、广东、广西等地, 具有温胃、祛风、散寒、行气、止痛的功效。现代研究表明高良姜主要含黄酮类、挥发油类和二芳基

庚烷类化合物, 其中黄酮类成分具有镇痛、止呕、抗氧化、降血糖、抗癌等药理作用, 与高良姜的功能主治相吻合, 是高良姜的主要药效物质基础。二芳基庚烷类化合物对前列腺素合成酶系有抑制作用, 高良姜的镇痛抗吐作用可能与此有关^[1]。有高良姜挥发油类成分及超临界提取物指纹图谱的研究^[2-4], 也有高良姜黄酮类成分薄层色谱指纹图谱的研究^[5]。本研究采用高效液相色谱法建立了高良姜黄酮提取物的指纹图谱, 进一步采用液质联用技术对提取物中的主要成分进行定性分析。

1 仪器与试剂

Waters 2695/2487 高精度高效液相色谱仪, Empower II 化学工作站; ACQUITY UPLC/Q-TOFMS

[收稿日期] 20110224(003)

[基金项目] 2006 年省部产学研结合专项资金项目 (2006D90504006)

[第一作者] 韩亮, 硕士, 助理研究员, 从事新药开发及质量控制, Tel: 020-39352400, E-mail: hanliang72@126.com

[通讯作者] * 冯毅凡, 本科, 教授, 从事中药开发与药物分析, Tel: 020-39352523, E-mail: yffeng@139.com

系统(美国 Waters 公司),采用电喷雾电离(ESI),二元高压泵、在线脱气装置、自动进样器、柱温箱和 TUV 检测器。数据采集与处理采用 Masslynx 软件。乙腈为色谱纯,美国 TEDIA 公司生产。甲酸、磷酸为分析纯,水为自制超纯水,其他试剂均为分析纯。高良姜黄酮提取物(超临界提取后的药渣进一步醇提水沉法处理得到)由广州中医药大学科技产业园提供,共 10 批。

2 方法与结果

2.1 HPLC 指纹图谱的建立

2.1.1 色谱条件 色谱柱 Sunfire™ C₁₈ (4.60 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相 A 乙腈-B 0.1% 磷酸溶液, 梯度洗脱 (0 ~ 30 min, 65% B; 30 ~ 40 min, 65% ~ 50% B; 40 ~ 45 min, 50% B; 45 ~ 50 min, 50% ~ 30% B; 50 ~ 55 min, 30% B; 55 ~ 60 min, 30% ~ 65% B), 分析时间 60 min; 检测波长 210 nm, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 30 °C, 进样量 10 μL。

2.1.2 供试品溶液的制备 取高良姜提取物 10 批, 每批 200 g。分别取约 35 mg, 精密称定, 置 10 mL 量瓶中, 加适量甲醇, 超声处理 (功率 250 W, 频率 33 kHz) 30 min, 放冷, 加甲醇定容, 摇匀, 用微孔滤膜 (0.22 μm) 滤过, 取续滤液, 即得。

2.1.3 精密度试验 取高良姜提取物 (批号 060504), 按 2.1.2 项下制备供试品溶液, 连续进样 6 次, 结果 10 个色谱峰相对保留时间的 RSD < 0.2%, 相对峰面积的 RSD < 1.7%, 表明精密度良好。

2.1.4 稳定性试验 取高良姜提取物 (批号 060504) 供试品溶液, 分别在 0, 3, 7, 9, 12, 15 h 进样, 结果各共有峰的相对保留时的 RSD < 0.8%, 相对峰面积的 RSD < 2.5%, 表明样品在 15 h 内稳定。

2.1.5 重复性试验 取高良姜提取物 (批号 060504) 6 份, 精密称定, 按 2.1.2 项下制备供试品溶液分别进样, 测定。结果各共有峰的相对保留时的 RSD < 1.8%, 相对峰面积的 RSD < 2.6%, 显示重复性良好。

2.1.6 提取物指纹图谱的建立 取 10 批供试品溶液, 按 2.1.2 项下进行分析。结果 10 批样品共标出 10 个共有峰。各批次共有峰相对保留时间 (以 6 号峰为参照峰) 见表 1, 相对面积见表 2。10 批样品 HPLC 指纹图见图 1。

2.1.7 相似度计算及标准指纹图谱的建立 相似度 (similarity) 是评价中药指纹图谱的一个重要参

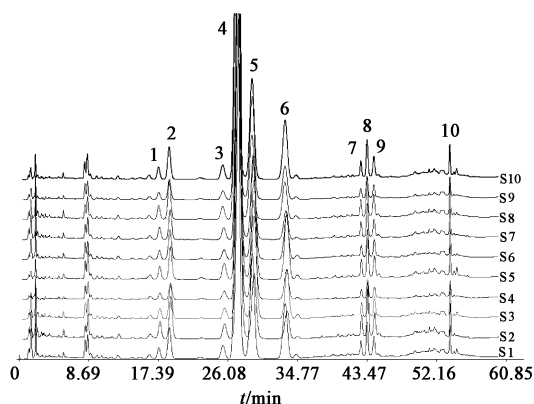


图1 高良姜提取物 HPLC 指纹图谱

数, 本实验主要采用药典委员会 2004A 中药色谱指纹图谱评价系统软件计算了 10 批高良姜黄酮提取物的相似度。标准指纹图谱见图 2。结果见表 3。

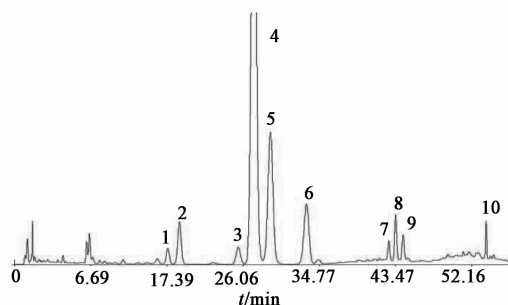


图2 高良姜提取物标准 HPLC 指纹图谱

2.2 高良姜提取物 UPLC/Q-TOFMS 分析

2.2.1 供试品溶液制备 取 2.1.2 项下供试品溶液, 稀释至约 1 g·L⁻¹ 即得。

2.2.2 液相色谱条件 色谱柱为 ACQUITY UPLC BEH C₁₈, (2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm, Waters 公司), 柱温 30 °C, 流动相 0.1% 甲酸水溶液 (A)-乙腈 (B), 梯度洗脱 (0 ~ 10 min, 30% B; 10 ~ 20 min, 30% ~ 50% B; 20 ~ 22 min, 50% B; 22 ~ 24 min, 50% ~ 70% B; 24 ~ 26 min, 70% B; 26 ~ 30 min, 70% ~ 100% B), 进样量 2 μL, 流速 0.2 mL·min⁻¹, 检测波长 280 nm。

2.2.3 质谱条件 LC-MS 系统使用 ESI 离子源, 在正离子模式下采集数据。数据采集范围 *m/z* 200 ~ 800。离子源参数: APCI +: 样品锥孔电压: 15 V, Probe 探针温度: 300 °C, 源温度: 130 °C, 雾化气 (N₂) 流速 50 L·h⁻¹, 脱溶剂气 (N₂) 流速 500 L·h⁻¹; APCI -: 样品锥孔电压: 35 V, 探针温度 350 °C, 源温度 130 °C, 雾化气 (N₂) 流速 50 L·h⁻¹, 脱溶剂气 (N₂) 流速 500 L·h⁻¹。

表 1 共有峰相对保留时间

min

峰号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	0.526	0.566	0.767	0.820	0.877	1.000	1.278	1.301	1.327	1.609
2	0.526	0.565	0.767	0.820	0.878	1.000	1.278	1.301	1.327	1.609
3	0.526	0.566	0.767	0.820	0.877	1.000	1.279	1.303	1.328	1.611
4	0.525	0.566	0.766	0.820	0.877	1.000	1.279	1.302	1.328	1.611
5	0.525	0.565	0.767	0.820	0.877	1.000	1.280	1.304	1.329	1.613
6	0.526	0.566	0.767	0.820	0.877	1.000	1.282	1.305	1.330	1.615
7	0.525	0.565	0.766	0.819	0.876	1.000	1.286	1.309	1.335	1.621
8	0.525	0.565	0.766	0.820	0.877	1.000	1.285	1.309	1.334	1.621
9	0.524	0.564	0.765	0.819	0.876	1.000	1.285	1.308	1.334	1.619
10	0.525	0.565	0.766	0.819	0.876	1.000	1.285	1.308	1.333	1.619
平均	0.525	0.565	0.766	0.820	0.877	1.000	1.282	1.305	1.331	1.615
RSD/%	0.10	0.11	0.06	0.08	0.08	0.00	0.24	0.24	0.24	0.30

表 2 共有峰相对峰面积

峰号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	0.414	1.056	0.482	10.051	2.461	1.000	0.357	0.742	0.444	0.299
2	0.133	0.489	0.197	6.921	2.178	1.000	0.141	0.308	0.207	0.166
3	0.136	0.370	0.242	12.853	3.460	1.000	0.125	0.270	0.174	0.146
4	0.122	0.328	0.213	6.310	1.513	1.000	0.115	0.255	0.158	0.126
5	0.125	0.473	0.189	7.577	2.424	1.000	0.114	0.265	0.181	0.144
6	0.261	0.700	0.358	11.524	2.999	1.000	0.246	0.524	0.325	0.239
7	0.221	0.678	0.291	7.909	2.254	1.000	0.198	0.457	0.287	0.241
8	0.132	0.407	0.222	10.910	3.099	1.000	0.117	0.269	0.178	0.150
9	0.125	0.369	0.208	6.467	1.688	1.000	0.117	0.264	0.168	0.142
10	0.123	0.384	0.204	6.849	1.887	1.000	0.110	0.255	0.164	0.122
平均	0.179	0.525	0.261	8.737	2.396	1.000	0.164	0.361	0.229	0.178
RSD/%	53.30	43.07	35.89	27.27	26.40	0.00	49.54	45.40	41.32	33.88

表 3 相似度比较

批号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
相似度	0.999 6	0.997 2	0.999 1	0.998 3	0.999 2	0.999 4	0.999 5	0.999 4	0.999 3	0.999 2

2.2.4 结果 以乙腈-0.1%甲酸水溶液为流动相进行线性梯度洗脱可得到较好的色谱分离效果(图3)。为了尽可能多的检测高良姜中的化学成分,选择末端吸收208 nm为检测波长。此类化合物为中等极性,使用ESI离子源;质谱正离子模式的总离子流图与紫外波长208 nm吸收所得色谱图主要色谱峰基本吻合。

根据质谱正离子模式分析结果(相对分子质量及元素组成信息),通过与文献数据对照^[6-8],对高良姜提取物UPLC分离出的10余个主要峰进行分析,大致确定了12个主要成分的可能结构,结果见表4。

3 讨论

3.1 测定波长的选择 在流动相条件下,采用二极管阵列检测其(DAD)进行了200~400 nm的紫外扫描,结果表明在末端吸收210 nm左右峰数最多,峰

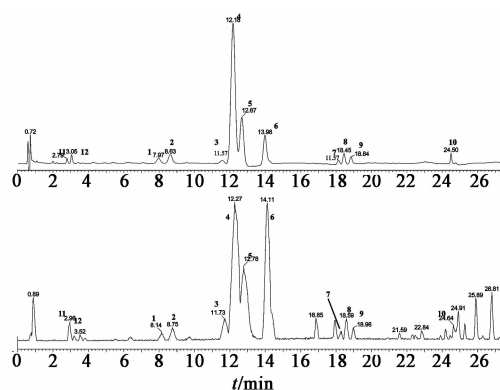


图 3 紫外波长检测的色谱和质谱总离子流

形较好,且分离好,基线稳定。故考虑在210 nm初检测,得到的指纹图谱重性良好。

3.2 流动相及洗脱方式的选择 分别考察了甲醇-水、乙腈-水体系,结果发现峰形较差,故考虑在水相

表4 高良姜提取物的 UPLC-MS 分析

峰号	t_R/min	$[M+H]^+ / m/z$	化学式	化合物名称
1	7.97	299.168 5	$C_{19}H_{22}O_3$	(5 <i>R</i>)-5-羟基-1-苯基-7-(4-羟基苯基)-3-庚酮
2	8.63	329.130 8	$C_{20}H_{23}O_4$	(5 <i>R</i>)-5-羟基-1-苯基-7-(3-甲氧基-4-羟基苯基)-3-庚酮
3	11.57	257.067 8	$C_{15}H_{12}O_4$	乔松素
4	12.18	271.028 4	$C_{15}H_{10}O_5$	高良姜素
5	12.67	301.036 2	$C_{16}H_{12}O_6$	山奈素-4'-甲醚
6	13.98	285.018 6	$C_{16}H_{12}O_5$	高良姜素-3-甲醚
7	18.14	281.136 6	$C_{19}H_{20}O_2$	1,7-二苯基-(5 <i>R</i>)-5-羟基-4-烯-3-庚酮
8	18.45	311.142 9	$C_{20}H_{22}O_3$	1-苯基-7-(3-甲氧基-4-羟基苯基)-4-烯-3-庚酮
9	18.84	265.139 6	$C_{19}H_{20}O$	1,7-二苯基-5-烯-3-庚酮,
10	24.50	265.136 0	$C_{19}H_{20}O$	1,7-二苯基-4-烯-3-庚酮
11	2.79	287.035 7	$C_{15}H_{10}O_6$	山奈素
12	3.05	317.052 9	$C_{16}H_{12}O_7$	槲皮素-3-甲醚

中加入适量的甲酸或磷酸。分别考察了 0.1%, 0.05% 磷酸, 结果表明水相中加入 0.1% 的磷酸, 峰形比较对称, 且分离良好。分析原因可能与高良姜提取物中黄酮类等酚酸性成分须在含酸的流动相中才能有好的峰形和分离。采用等度洗脱分析时间长且分离效果不佳, 无法使共有峰分离良好, 采用梯度洗脱后 1, 2 号峰, 4, 5 号峰基本分开。

3.3 高良姜总黄酮提取物的制备方法 本研究中的高良姜提取物是取高良姜超临界提取后的药渣, 采用醇提水沉的方法得到, 由于超临界提取已经除去了药材中大部分的挥发油类、二芳基庚烷类低极性成分, 因此该提取物中是以黄酮类成分为主的高极性成分, 成分分析结果也验证了这一点。

3.4 液质分析结果讨论 UPLC 是最先进的液相色谱技术, 具有超高压, 超高灵敏度, 超高分离度的特点, 它是 LC-MS 成功分析的前提和基础, 肩负着样品分离和输送的功能。Q-TOF 质谱是高分辨串联质谱, 显著特点是灵敏度高和选择性强, 得到的质谱谱图数据完整并且品质高, 因而在天然产物, 新药开发, 药代研究和蛋白质组学等领域占有重要地位。本文通过 UPLC/Q-TOFMS 对高良姜提取物进行成分分析, 在 26 min 内快速分离出十几个主要成分, 并鉴定了其中 12 个化合物。

3.5 指纹图谱的建立 本研究取连续 10 批高良姜

提取物进行了分析, 从相似度分析结果来看各批次间差异很小, 说明提取工艺稳定性好。本研究所建立的指纹图谱方法操作简单, 重复性好, 可用于高良姜提取物的质量控制。

[参考文献]

- [1] 吕玮, 蒋伶活. 高良姜的化学成分及药理作用[J]. 药学专论, 2006, 15(3): 19.
- [2] 钱浩泉, 李彩君, 谢培山. 高良姜及其近缘植物挥发油成分的气相色谱指纹图谱研究[J]. 中药新药与临床药理, 2001, 12(3): 179.
- [3] 崔维利, 冯毅凡, 郭晓玲, 等. 高良姜中二苯基庚烷 A 的含量测定及指纹图谱研究[J]. 中成药, 2007, 29(2): 298.
- [4] 冯毅凡, 周漩, 郭晓玲. 向量夹角法评价不同产地与商品来源的高良姜挥发油指纹图谱相似度[J]. 中药材, 2006, 29(1): 10.
- [5] 李彩君, 林巧玲, 谢培山, 等. 高良姜中黄酮类成分薄层色谱指纹图谱鉴别[J]. 中药新药与临床药理, 2001, 12(3): 183.
- [6] 周改莲, 辛宁, 黄陆良. 高良姜的化学成分研究[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(6): 1376.
- [7] 安宁, 杨世林, 邹忠梅, 等. 高良姜黄酮类化学成分的研究[J]. 中草药, 2006, 37(5): 663.
- [8] 罗辉, 蔡春, 张建和, 等. 高良姜化学成分研究[J]. 中药材, 1998, 21(7): 349.

[责任编辑 蔡仲德]